

UNIVERSIDAD DE PANAMA
MAESTRIA EN ENTOMOLOGIA MEDICA



CARACTERIZACION ENZIMATICA DE ALGUNOS MIEMBROS DEL
COMPLEJO *flaviscutellata* DEL GENERO *Lutzomyia*
(Diptera: Psychodidae).

por

BEVERLY GOMEZ

REPUBLICA DE PANAMA

1989

MAR 29 1989

CARACTERIZACION ENZIMATICA DE ALGUNOS MIEMBROS DEL
COMPLEJO *flaviscutellata* DEL GENERO *Lutzomyia*
(Diptera; Psychodidae).

TESIS

Sometida a consideración del Jurado Calificador para
optar al título de Magister en Ciencias con especialidad
en ENTOMOLOGIA MEDICA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

DIRECCION DE POSTGRADO

Aprobado:

ASESOR

COMITE

COMITE

Obs. del Autor

734936

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
 I.-INTRODUCCION.....	 1
 II.-REVISION DE LITERATURA.....	
1.- La leishmaniasis cutánea en el Nuevo Mundo producidas por miembros del subgénero <i>Leishmania</i>	 6
2.- El complejo <i>flaviscutellata</i> del género <i>Lutzomyia</i>	 18
3.- La electroforesis de enzimas y su importancia.....	 28
 III.- MATERIALES Y METODOS.....	
1.- Material biológico.....	42
2.- Método de colecta.....	42
3.- Identificación de los flebótomos.....	43
4.- Preparación de los homogenados.....	44
5.- Ensayos electroforéticos.....	44
6.- Análisis de datos.....	49
 IV.- RESULTADOS.....	 51
 VI.- DISCUSION.....	 63
 VII.-CONCLUSIONES.....	 70
 VIII.-RECOMENDACIONES.....	 71
 IX.-LITERATURA CITADA.....	 73

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. John Petersen, por su orientación y ayuda intelectual durante todas las etapas de este estudio, así como su paciencia, dedicación y análisis crítico durante la revisión y discusión del manuscrito.

Mi especial gratitud al Dr. Jorge Arias por su constante apoyo, ayuda y orientación en las colectas de insectos de Panamá, por suministrarme los insectos provenientes de Brasil utilizados en este trabajo y por sus acertados comentarios y orientación en la redacción del manuscrito y elaboración de las gráficas.

A la Lic. Coralia Luna y la Lic. Anita de Vasquez por ayudarme en los pequeños-grandes secretos de la técnica de electroforesis en láminas de acetato de celulosa. También deseo expresar mi agradecimiento al Sr. Roberto Rojas por su invaluable ayuda y asistencia técnica en el montaje de especímenes y al Dr. Eustorgio Mendez por su valiosa colaboración.

Al Laboratorio Commemorative Gorgas por facilitarme el equipo y materiales necesarios para la realización de este

estudio. Al personal del Departamento de Biología Tropical por su amistad, alegría y contagioso entusiasmo que hicieron grata mi estadía en esa dependencia.

Mi especial agradecimiento a la Universidad de Panamá, por su soporte financiero dándome así la oportunidad de continuar mis estudios. A mis profesores y compañeros por su amistad y confianza en todo momento.

Y finalmente a todas aquellas personas que de una u otra manera me brindaron su apoyo, muy especialmente a mi familia que me permitió este "paréntesis" en mi vida, a José y a la Divina Providencia.

CARACTERIZACION ENZIMATICA DE ALGUNOS MIEMBROS DEL
COMPLEJO *flaviscutellata* DEL GENERO *Lutzomyia*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE).

RESUMEN

Dos especies simpátricas procedentes de Manaus, Brasil, *Lutzomyia olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata* y una de Panamá, *Lu. olmeca bicolor*, pertenecientes al complejo *flaviscutellata* fueron examinadas por el método de electroforesis de enzimas en láminas de acetato de celulosa. Once sistemas enzimáticos fueron examinados, de los cuales fosfoglucomutasa (PGM), glucosafofosfato isomerasa (PGI) y glicerofosfato deshidrogenasa (GPD) suministraron información útil para el análisis genético. Alanina amino transaminasa (ALAT), aspartato amino transaminasa (ASAT) y fructoquinasa (FK) no mostraron actividad. El análisis de la frecuencia alélica y los valores de identidad (I) y distancia genética (D) calculados por el método de Nei nos indican que estas especies están genéticamente muy relacionadas, no existiendo evidencias de aislamiento reproductivo entre las especies simpátricas de Brasil. En ninguno de los sistemas enzimáticos analizados hubo evidencias de loci diagnósticos, por lo tanto con la información obtenida no se puede hacer una diferenciación de especies sugiriéndose la utilización de mayor número de loci en trabajos posteriores.

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF SOME MEMBERS OF
THE *Lutzomyia flaviscutellata* COMPLEX
(DIPTERA: PSYCHODIDAE)

SUMMARY

Two sympatric sand fly species collected near Manaus, Brazil, *Lutzomyia olmeca nociva* and *Lu. flaviscutellata*, and a Panamanian species, *Lu. olmeca bicolor*, all members of the *flaviscutellata* complex were examined by the method of cellulose acetate isoenzyme electrophoresis. Of the eleven enzyme systems examined, phosphoglucomutase (PGM), glucose phosphate isomerase (PGI), and glycerophosphate dehydrogenase (GPD) provided allele frequency data that permitted genetic analysis. Alanine aminotransferase (ALAT), aspartate amino transferase (ASAT), and phosphofructokinase (FK) did not show enzyme activity. Analysis of allele frequency data and the calculation of identity (I) and genetic distance (D) by Nei's method indicated that these species were closely related genetically, there being no evidence of reproductive isolation between the sympatric Brazilian species. Diagnostic enzyme loci were not evident in any system examined. The information obtained in this study did not fully differentiate the species examined, suggesting that future studies incorporate a larger number of enzyme loci.

LISTA DE CUADROS

	Página
CUADRO I.- Soluciones buffer utilizadas durante el proceso de la electroforesis.....	46
CUADRO II.-Sustratos y métodos de visualización de las reacciones enzimáticas ocurridas durante el proceso de la electroforesis....	47
CUADRO III.-Condiciones de la corrida electroforética para cada enzima.....	48
CUADRO IV.-Características de 12 loci estudiados cuando los datos de <i>Lu. o. bicolor</i> , <i>Lu. o. nociva</i> y <i>Lu. flaviscutellata</i> son considerados en conjunto.....	57
CUADRO V.- Número de individuos observados en cada genotipo en tres loci polimórficos para <i>Lu. o. bicolor</i> , <i>Lu. o. nociva</i> y <i>Lu. flaviscutellata</i>	58
CUADRO VI.-Frecuencia alélica de tres loci en tres especies del complejo <i>flaviscutellata</i>	60
CUADRO VII.-Heterocigosidad observada, esperada y heterocigosidad promedio para 3 loci en <i>Lu. o. bicolor</i> , <i>Lu. o. nociva</i> y <i>Lu. flaviscutellata</i>	62
CUADRO VIII.-Identidad y Distancia genética calculada por el método de Nei para 3 miembros del complejo <i>flaviscutellata</i>	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA I.- Distribución de leishmanias del subgénero <i>Leishmania</i> en el Nuevo Mundo.....	14
FIGURA II.- Distribución aproximada del complejo <i>flaviscutellata</i>	22
FIGURA III.- Expresión fenotípica de cuatro enzimas: PGM, PGI, GPD y ME.....	32
FIGURA IV.- Expresión fenotípica de tres enzimas estudiadas MDH, MPI y G6PDH.....	55

INTRODUCCION

La identificación precisa de las especies de importancia médica es fundamental para estudios posteriores sobre la ecología, el comportamiento, la determinación de la capacidad vectorial y la subsecuente planificación de estrategias de control de las enfermedades transmitidas por insectos.

Varios grupos de vectores conforman complejos de especies, es decir, grupos de especies muy relacionados, los cuales son muy similares o morfológicamente indistinguibles por los métodos taxonómicos tradicionales, aún cuando puedan ser diferentes con respecto a sus características ecológicas, de comportamiento y capacidad vectorial (especies gemelas o "sibling species").

El complejo *flaviscutellata* del género *Lutzomyia* está integrado por un número de especies que reúnen estas características. Hasta el momento incluye seis miembros, indistinguibles por sus características morfológicas externas, cuatro de ellas son vectores probados de la leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo producida por

parásitos del género *Leishmania*, subgénero *Leishmania*. Dos miembros de este complejo *Lu. flaviscutellata* y *Lu. olmeca nociva* son simpátricas en Brasil y ambas con capacidad vectorial probada y hasta hace pocos años se les consideró como una especie única. *Lu. olmeca bicolor* es la única representante del complejo en Panamá, por lo que estas tres especies han sido seleccionadas para el presente estudio donde se intenta hacer un análisis de la diversidad genética de ellas.

La rama de la genética que se encarga del estudio de la composición genética de las poblaciones es la genética de poblaciones, que comprende la determinación de las frecuencias alélicas en una población, la interacción de los alelos en uno o diferentes loci, con especial interés en las vías divergentes que siguen las poblaciones después de un aislamiento reproductivo. La detección y medida de la variación genética se puede hacer por observación directa de los individuos, pero, la citogenética, especialmente el estudio de cromosomas politénicos y el análisis de enzimas o tejidos por electroforesis, han sido de gran utilidad para la identificación de las especies que conforman complejos y en la diferenciación de las especies gemelas.

El estudio de los cromosomas politénicos de larvas de Diptera, magnificados con la ayuda de microscopios de contraste de fase ha permitido determinar la variación citológica, pero cambios a nivel de los loci de los genes subyacen mas allá de la resolución del microscopio. En el estudio de la genética de poblaciones es necesario que alelos individuales sean reconocidos, lo que requiere de procedimientos tecnicos que magnifiquen las variaciones a este nivel de una manera comparable a la magnificación de los cambios cromosomales con el microscopio compuesto. Estos requerimientos han sido satisfechos por la tecnica de electroforesis.

Los estudios electroforéticos en flebótomos comenzaron cuando Miles y Ward (1978) examinaron 10 enzimas en *Lu. flaviscutellata* de Brasil. Estos autores investigaron métodos de almacenamiento y preparación de homogenados. Cinco enzimas, MDH, ME, PGM, ES y GPI fueron detectadas, con clara resolución cuando utilizaban enzimas estabilizadoras, recomendando la utilización de las enzimas PGM, GPI y MDH para estudios posteriores. Estos autores utilizaron gel de almidón como soporte. Tibayrenc et al. (1980) estudiaron seis enzimas en *Lu. umbratilis* de Guyana Francesa; Ward et al. (1981a) estudiaron el polimorfismo genético de *Phlebotomus*

perniciosus y la diferenciación de ocho especies adicionales de flebótomos de Francia y Túnez. Ward et al., (1981b) encontraron que de catorce enzimas estudiadas en *Phlebotomus perfiliewi perfiliewi*, vector de leishmaniasis visceral en el Viejo Mundo solo fosfoglucomutasa mostró polimorfismo.

Petersen (1982) realizó un estudio en cinco especies antropofílicas panameñas, sospechosas de ser vectores de *Leishmania braziliensis*, los resultados obtenidos muestran que las especies de *Lutzomyia* examinadas son claramente diferenciables genéticamente, resultados que eran esperados ya que eran especies morfológicamente distintas.

Petersen (1985) examinó la asociación que podía existir entre la variación enzimática con la variación morfológica de *Lu. longipalpis*, *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. olmeca olmeca* de Costa Rica. Los resultados sugieren que el flujo genético entre las poblaciones en estudio es restringido, pero la distancia (física) entre las poblaciones muestreadas pudiera ser un factor importante en los resultados.

Once sistemas enzimáticos fueron analizados para comparar dos especies crípticas previamente consideradas como *Psychodopygus carrerai* por Caillard et al., (1986).

Dos sistemas enzimáticos fueron diagnósticos. Otros tres loci dieron evidencias de aislamiento reproductivo, por la frecuencia genotípica dada por el equilibrio de Hardy-Weinberg y las frecuencias alélicas diferentes. La distancia genética entre las dos especies es relativamente pequeña, sugiriendo que están muy relacionadas genéticamente.

Este estudio tiene como objetivos específicos:

- 1.- Caracterizar por el método de electroforesis de enzimas tres miembros del complejo *flaviscutellata*: *Lutzomyia olmeca bicolor*, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata*.
- 2.- Calcular la divergencia genética entre *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata*.

REVISION DE LA LITERATURA

1. La leishmaniasis cutanea humana en el Nuevo Mundo producida por miembros del subgénero *Leishmania*.

La leishmaniasis ocupa el sexto lugar entre las enfermedades transmitidas por vectores en el mundo. Se calcula que anualmente hay 400,000 casos (Marinkelle, 1980). Pero probablemente este número es mas grande considerando que no es una enfermedad de notificación obligatoria. Debido a su alta morbilidad, es considerada un importante problema de salud pública (Zeledón, 1985).

La leishmaniasis es causada por un protozoario del orden Kinetoplastida, de la familia Trypanosomatidae del género *Leishmania*.

La posición taxonómica de las especies del genero *Leishmania* está siendo revisada y definida al presente y por consiguiente no hay acuerdo entre los que trabajan con este grupo de parásitos. Por mucho tiempo se consideró que existían una o dos especies de *Leishmania* en el Nuevo Mundo. Las investigaciones de Lainson y Shaw (1970) mostraron que en realidad se trata de varias especies que podían ser divididas en dos grandes grupos.

Estos dos grupos fueron llamados aquellos de crecimiento lento y los de crecimiento rápido. Estos mismos autores, después de haber estudiado el comportamiento, morfología y bioquímica de muchas cepas confirmaron sus ideas originales e informalmente los denominaron como del "grupo" *mexicana* (los de rápido crecimiento) y los del "grupo" *braziliensis* (los de crecimiento lento) (Lainson & Shaw, 1972).

Prosiguiendo con el estudio del grupo, Lainson & Shaw (1979) establecieron otra nomenclatura informal para las leishmanias. Esta vez las caracterizaron por la localidad donde se desarrollan en el tubo digestivo de los vectores. Con esta información pasaron a llamar a los parásitos del grupo *mexicana* como siendo de la sección *Suprappylaria* y los del grupo *braziliensis* como siendo de la sección *Peripylaria*. La mayoría de los autores utilizaron esta nomenclatura, pero cuando estos autores (Lainson & Shaw, 1987) pasaron a agruparlos formalmente en subgéneros, algunos autores no quisieron adoptar sus recomendaciones. No obstante, en este trabajo utilizaremos esta nomenclatura. Aquellos parásitos de crecimiento rápido, denominados del grupo *mexicana*, o de la sección *Suprappylaria*, fueron ubicados en el subgénero *Leishmania*, en cuanto aquellos de

crecimiento lento, denominados del grupo *braziliensis* o de la sección *Peripylaria* fueron ubicados en el subgénero *Viannia*.

Las leishmanias incluidas en el subgénero *Leishmania* tienen por características que al ser inoculados en hamsters dorado (*Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839)) tienen crecimiento rápido, formando un tumor grande que contiene un número elevado de amastigotas. En los medios de cultivo se desarrollan muy bien por lo que permiten ser aislados fácilmente de sus vectores, animales silvestres o el hombre. En su mayoría son transmitidas por flebótomos muy relacionados entre sí y pertenecientes al complejo *flaviscutellata* del género *Lutzomyia*. El desarrollo del parásito en el vector está circunscrito al intestino medio y anterior del insecto (Lainson & Shaw, 1972; Lainson, 1983; 1988).

El subgénero *Leishmania* incluye las siguientes especies:

Leishmania mexicana Biagi 1953 *emend.* Garnham, 1962.
Leishmania amazonensis Lainson & Shaw, 1972.
Leishmania aristidesi Lainson & Shaw, 1979; *emend.*
 Lainson & Shaw, 1986.
Leishmania venezuelensis Bonfante-Garrido, 1980

Posibles miembros adicionales de este subgénero son:

Leishmania pifanoi Medina & Romero, 1959 *emend.*
 Medina & Romero, 1962.
Leishmania garnhami Scorza, Valera, Scorza, Carnivalli, Moreno & Lugo-Hernandez, 1979.

Los parásitos incluidos en el subgénero *Viannia* son los de crecimiento lento. Al ser inoculados en hamsters producen pequeños nódulos en la piel los cuales son pobres en parásitos y los amastigotas y promastigotas son pequeños. En el vector se producen unidos a la pared del intestino posterior como flagelados pequeños y redondeados, de aquí migran hacia el intestino medio donde los promastigotas alargados y libres se multiplican antes de invadir las piezas bucales (Lainson & Shaw, 1972; Lainson, 1983, 1988).

El subgénero *Viannia* incluye las siguientes especies:

Leishmania braziliensis Vianna, 1911
emend. Matta, 1916.
Leishmania guyanensis Floch, 1954.

Leishmania panamensis Lainson & Shaw, 1973.

Leishmania peruviana Velez, 1915.

Las leishmanias circulan en la naturaleza de un mamífero a otro por la picadura de un díptero de la familia Psychodidae, vulgarmente llamado flebótomo. Los hospederos vertebrados naturales son referidos como los reservorios, aunque en algunos focos de leishmaniasis visceral humana en el Viejo Mundo se ha propuesto que el hombre es el reservorio debido a la ausencia de un animal que actúe como reservorio (Killick-Kendrick & Ward,

1981). En la década de los años 50 se obtuvieron evidencias que sugieren que la leishmaniasis cutánea en América es una zoonosis (Forattini & Santos, 1955; Floch, 1957; Garnham & Lewis, 1959.)

Los flebótomos fueron sospechosos de ser los posibles vectores de la enfermedad desde 1905 (Sergent & Sergent, 1905; Pressat, 1905) trabajando en el norte de Africa. El papel de los flebótomos como vectores fué confirmado por Shortt et al., (1931) cuando lograron la transmisión de *Leishmania donovani* de la India a hamsters por medio de *Phlebotomus argentipes* infectados.

En el vertebrado, la forma parasitaria es amastigota intracelular del sistema macrofágico. Algunas especies causan leishmaniasis cutáneas y/o mucocutáneas y otras causan leishmaniasis visceral con la presencia del parásito en el hígado, bazo y medula ósea. La leishmaniasis cutánea se distribuye en las zonas tropicales y subtropicales del Viejo y Nuevo Mundo. Es una enfermedad selvática, periselvática y rural. Rara vez es considerada urbana (Moulineux & Ashford, 1983) y bajo circunstancias especiales puede ocurrir en áreas periurbanas. Los focos se encuentran en su mayoría en pequeñas poblaciones situadas en la proximidad de la floresta. Es muy rara en regiones xerófilas

a no ser que existan microclimas favorables a la persistencia de una entomofauna capaz de mantener la transmisión (Bonfante-Garrido, 1983). Esta enfermedad se encuentra en una fase de incremento debido primariamente al incremento de la población, que está invadiendo áreas anteriormente boscosas, para hacer nuevos poblados, sitios para establecer industrias para el desarrollo de la agricultura (Zeledón, 1985), minería, construcción de carreteras (Salem & Arias, 1979).

Estudios morfométricos, de comportamiento *in vivo* e *in vitro* además de técnicas bioquímicas han sido utilizados para la identificación de las especies de *Leishmania*, ya que, en muchos casos los cuadros clínicos no son especie específicos. Los métodos bioquímicos se desarrollaron debido a la obtención de múltiples aislados de comportamiento diferente y de similitud en características morfológicas, comenzando así la caracterización del parásito por densidad de flotación del ADN del kinetoplasto (Chance *et al.*, 1974), electroforesis de enzimas (Chance, 1979; Gardener, 1980), hibridización de cadenas de ADN del kinetoplasto (Chance, 1976; Barker & Butcher, 1983; Wirth & McMahon-Pratt, 1982) y finalmente por la técnica de anticuerpos monoclonales (McMahon-Pratt & David, 1981).

En el hombre, la leishmaniasis dérmica o cutánea del Nuevo Mundo se ha encontrado en toda la América, desde el Sur de los Estados Unidos (Texas y Oklahoma) hasta Paraguay y la parte norte de Argentina, no habiendo sido reportada en Canadá, Uruguay o Chile. (W.H.O., 1981). Se presenta bajo diversas formas clínicas que reciben el nombre de leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis cutáneo-mucosa (LMC) y leishmaniasis cutáneo-difusa (LCD).

Los reservorios de las especies del subgénero *Leishmania* incluyen una variedad de roedores selváticos y se encuentran menos frecuentemente en otros vertebrados que comparten el mismo habitat, tales como marsupiales, zorros, perros y asnos, por lo que se le considera a la enfermedad una zoonosis entre los roedores siendo mantenida por flebótomos que manifiestan una preferencia alimentaria hacia ellos muy marcada, como es el caso de los miembros del complejo *flaviscutellata*. Varios miembros de este complejo han sido incriminados en la transmisión de estos parásitos como vectores primarios (Lainson & Shaw, 1968; Arias & Naiff, 1981).

Leishmania (L.) mexicana se encuentra distribuida desde el sur de México (Yucatán) hasta Guatemala y Belice. Su presencia ha sido notada en pocos casos en el

sur de los Estados Unidos (Figura 1) (Lainson & Shaw, 1987). La enfermedad cutánea que este parásito causa es conocida como "Úlcera de chiclero" desde que afecta típicamente a los colectores de chicle y caucho durante sus labores en el bosque. Las lesiones que estos presentan son predominantemente en la cara y las orejas que están expuestas a las picaduras del vector. Esta forma de la enfermedad es relativamente leve y generalmente se presenta una sola lesión que con frecuencia se localiza en la oreja causando destrucción del pabellón auricular (Biagi, 1953).

Leishmania (L.) amazonensis se encuentra distribuida desde Panamá hasta Brasil (Gráfica I) (Lainson & Shaw, 1987). A principios de la década del 80 en el Laboratorio Gorgas se estudiaron siete aislados obtenidos de soldados del Fuerte Sherman que por su perfil isoenzimático fueron identificados como *L. amazonensis*, pero hasta el momento no se han hecho estudios epidemiológicos de estos casos. Su presencia en Panamá ha sido confirmada recientemente por Petersen et al., (1988). En este país poco se conoce sobre el ciclo de transmisión de este parásito, pero presumiblemente el vector sea un miembro del complejo *flaviscutellata* y en Panamá el único miembro conocido de este complejo es *Lutzomyia olmeca bicolor*. Su reservorio en este país probablemente es un roedor silvestre.

- 1.- L. (L.) MEXICANA.
- 2.- L. (L.) AMAZONENSIS.
- 3.- L. (L.) ARISTIDESI.
- 4.- L. (L.) VENEZUELENSIS.
- 5.- L. (L.) PIFANOI.
- 6.- L. (L.) GARNHAMI.



Figura I. DISTRIBUCION DE LAS ESPECIES DE LEISHMANIAS DEL SUBGENERO *Leishmania* EN EL NUEVO MUNDO.

En Venezuela se han encontrado seis casos de leishmaniasis cutáneo-difusa producida por esta especie, pero se desconoce su ciclo de transmisión (Castellanos, 1980). También han sido reportados casos de *Leishmania (L.) pifanoi* responsable de un cuadro también difuso de la enfermedad (Medina & Romero, 1959) y *Leishmania (L.) garnhami* en un área rural y sub-urbana de las tierras altas de los Andes venezolanos entre 800 y 1800 metros sobre el nivel del mar (Scorza et al., 1979).

En Brasil este parásito ocurre con mayor frecuencia y es responsable de causar lesiones simples clásicas, lesiones múltiples y hasta la forma difusa. De los cientos de casos humanos de leishmaniasis cutánea de Belém, Estado de Pará, solo el 5% se debe a este parásito y seis de ellos (30%) han evolucionado hacia una leishmaniasis cutáneo-difusa (Lainson, 1983). En cambio, en Manaus, Estado de Amazonas, solamente se han reportado seis casos de millares examinados y de estos ninguno ha evolucionado hacia la forma cutáneo-difusa (Arias & Naiff, 1981). En la mayoría de su distribución suramericana el vector principal es *Lutzomyia flaviscutellata* (Lainson & Shaw, 1968; Arias et al., 1987), pero en la región de Manaus, también se ha encontrado a una segunda especie, responsable de su transmisión, *Lutzomyia olmeca nociva* (Arias et al., 1987). El reservorio principal en el Amazonas, donde más

se ha estudiado esta especie, es la rata espinosa, *Proechymis guyannensis* (Geoffroy, 1803) habiendo sido aislado de una gran variedad de otros animales silvestres que posiblemente no actúan como reservorios sino simplemente sean otros animales infectados (Lainson & Shaw, 1979). En estos animales las infecciones son usualmente inaparentes con los parásitos restringidos a la piel de la base de la cola y las orejas donde generalmente no producen ninguna lesión visible.

Leishmania (L.) venezuelensis. Bonfante-Garrido et al., (1973) describieron varios casos con lesiones múltiples en el Estado Lara, Venezuela; posteriormente Bonfante-Garrido y Barreto (1981) describieron lo que ellos consideraron ser un caso de leishmania cutáneo-difusa. Después de este reporte tres otros casos de leishmaniasis cutánea han sido encontrada en individuos quienes aparentemente contrajeron la enfermedad en el mismo habitat. Estos cuatro pacientes respondieron al tratamiento lo que sugiere que estos casos no están asociados a la leishmaniasis cutáneo-difusa típica. El desarrollo en hamster claramente indicó que el parásito pertenece al complejo *mexicana*, pero sus características de desarrollo en cultivo y caracteres isoenzimáticos v

condujeron a Bonfante-Garrido (1982) a considerar a esta leishmania como un taxon diferente de las existentes hasta ese momento. Estudios entomológicos realizados en el área hacen incriminar a *Lu. olmeca bicolor* como el posible vector.

Leishmania (L.) aristidesi. Este parásito fué encontrado por Herrer et al., (1971) en Panamá en roedores y un marsupial, no habiendo sido reportado en el hombre hasta el momento. El vector es desconocido, pero debido a las características rodentofilicas de *Lu. olmeca bicolor* es considerado como el probable transmisor de esta leishmania.

2. El complejo *Lutzomyia flaviscutellata*.

Los flebótomos son insectos del orden Diptera, suborden Nematóceras, familia Psychodidae, subfamilia *Phlebotominae*. Son insectos de pequeño tamaño (1 a 5 mm) de cuerpo piloso y patas largas y delicadas, de torax convexo y alas lanceoladas también cubiertas de pelo. Las hembras presentan la proboscide bien desarrollada debido a sus hábitos hematófagos (Forattini, 1973). Aspectos que caracterizan a los miembros de la subfamilia *Phlebotominae* son alas con un sector radial de cuatro ramas, palpos de cinco segmentos, no poseen puente interocular, segmentos antenales piriformes o subcilíndricos, piezas bucales mas largas que la cabeza, adaptadas para la succión de sangre, hembras con dos espermatecas y aedeago del macho bífido.

Esta subfamilia tiene distribución cosmopolita y hasta el momento comprende seis géneros: *Brumptomyia*, *Lutzomyia*, *Marileya* y *Psychodopygus* del Nuevo Mundo, *Phlebotomus* y *Sergentomyia* del Viejo Mundo. Los vectores de la leishmaniasis tanto visceral como cutánea en el Nuevo Mundo están incluidos dentro del género *Lutzomyia*.

Género *Lutzomyia* Franca, 1924.

Especie tipo: *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912.

Hembras con cibario armado consistente en una hilera de dientes horizontales y una o mas hileras de dientes verticales en la mayoría de las especies. Un bulbo posterior en la pared dorsal del cibario. Faringe desarmada en la mayoría de las especies, armado en algunas. Espermatecas de forma variada, segmentadas o no. Genitalia del macho simple o con varios procesos y setas especializadas sobre la coxita, parámetros o lóbulos laterales. Stili con 1 a 3 setas largas (dististilo) y de 1 a 3 setas cortas, una de las cuales es subterminal en muchas especies. El total de setas del stili no sobrepasan de 7. Las larvas de cuarto estadio con 4 cerdas caudales (Theodor, 1965).

Subgénero *Nyssomyia* Barretto, 1962.

Subgénero tipo: *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912.

El grupo ha sido definido por varios autores incluyendo a Barretto (1962) y Theodor (1965) como grupo *intermedia*.

La mayoría de las especies que comprende este subgénero son antropofílicas y vectores probados o

sospechosos de la leishmaniasis cutánea y de ciertos arbovirus. Los miembros de este subgénero presentan antenas con espinas geniculadas (ascoides) simples; palpos con el quinto segmento mas corto, del mismo largo o mas largo que el tercero, fémures posteriores sin espinas, basistilo sin tufo de cerdas, dististilo con cuatro espinas, una de las cuales es terminal y sin cerda espiniforme subterminal, parámetros simples y sin cerdas o espinas modificadas, lóbulos laterales inermes, cibario de la hembra con 10 o 12 dientes con excepción de *Lu. flaviscutellata* que tiene seis dientes y *Lu. olmeca reducta* que tiene ocho dientes. Numerosos dentículos verticales dispuestos en varias hileras. Presentan el área pigmentada nitida y el arco cibarial esclerotizado completo. Las espermatecas con segmentos no imbricados, aunque a veces con ligero imbricamiento, siendo el segmento distal un poco mas grande que los otros que van disminuyendo de tamaño, hasta que el proximal tenga un diámetro un poco superior al ducto individual con excepción de *Lu. intermedia* y *Lu. trapidoi* en que el segundo segmento basal es mas bien mas ancho que el ducto individual. La cabeza de las espermatecas son por lo general muy voluminosas, los ductos individuales delgados y relativamente largos con la excepción de la subespecie recientemente descrita *Lu. olmeca reducta*, los cuales

pueden abrirse o no en un ducto común (Barretto, 1962; Feliciangeli et al., 1988).

El complejo *flaviscutellata* comprende seis miembros, considerados dentro de tres especies. Una de ellas incluye cuatro subespecies:

- Lu. flaviscutellata* (Mangabeira, 1942).
- Lu. olmeca olmeca* (Vargas & Díaz Najera, 1959).
- Lu. olmeca bicolor* Fairchild & Theodor, 1971.
- Lu. olmeca nociva* Young & Arias, 1982.
- Lu. olmeca reducta* Feliciangeli, Ramirez & Ramirez, 1988.
- Lu. inornata* Martins, Falcao & Da Silva, 1965.

Estas especies son rodentofílicas y mantienen la transmisión de varias leishmanias del subgénero *Leishmania* entre mamíferos del bosque y al hombre, produciéndole una lesión de tipo cutánea o cutánea difusa (Lainson & Shaw, 1979). Los miembros de este complejo tienen una amplia distribución habiendo sido reportados en México, Guatemala, Belice, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Trinidad, Guyana Francesa, Surinam, Brasil, Ecuador, Perú y Bolivia (Figura II). Flebótomos de este complejo han sido encontrados infectados con leishmanias en Brasil, Trinidad, Venezuela, Belice, Guatemala, Costa Rica, y Colombia (Lainson & Shaw, 1979; Young, 1979; Young & Arias, 1982).



 L. FLAVISCUTELLATA

 L. OLMECA BICOLOR

 L. OLMECA OLMECA

 L. OLMECA NOCIVA

Figura II. DISTRIBUCION APROXIMADA DEL COMPLEJO flaviscutellata.

Estas especies y subespecies presentan una coloración muy conspicua que las separa fácilmente de todas las otras especies de flebótomos del Nuevo Mundo. La cabeza, el pronotum, el mesonotum y el extremo anterior del mesoepisternum son de color castaño oscuro, en contraste con la parte posterior del mesonotum, escutelum, coxas y pleuras que son de color pálido (Fairchild & Theodor, 1971). *Lu. inornata* presenta el escutelum oscuro y así difiere acentuadamente de los demás miembros del complejo. Rasgos de la espermateca y sus ductos, de la armadura cibarial, palpos y antenas son aspectos diagnósticos para las otras hembras del complejo (Young & Arias, 1982).

Lutzomyia flaviscutellata (Mangabeira, 1942), es una especie con una acentuada preferencia alimentaria por los roedores, por lo que no hay duda que desempeña un importante papel en la transmisión de la leishmaniasis en su sitio enzootico natural (Biagi et al., 1965; Forattini, 1973; Shaw & Lainson, 1968; Ward et al., 1973). Esta especie ha sido encontrada naturalmente infectada con *Leishmania amazonensis* en el bosque de Utinga, Estado de Pará (Lainson & Shaw, 1968) y en Manaus, Estado de Amazonas, Brasil (Arias et al., 1987).

Posteriormente el parásito fué transmitido de hamster a hamster con especímenes criados en el laboratorio por Ward et al., (1977), completando la serie de evidencias que incriminan este insecto como el principal vector en la naturaleza para el hombre, produciéndole una leishmaniasis cutánea simple o difusa (Lainson, 1983). Este flebotomino tiene amplia distribución geográfica en América del Sur. Ha sido reportado en la región Amazónica de Brasil, Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, Guyana Francesa, Trinidad y Surinam.

Lutzomyia olmeca olmeca (Vargas & Diaz Najera, 1959). Actualmente esta especie es considerada el vector de leishmaniasis tegumentaria en áreas de México y América Central (Biagi et al., 1965; Disney, 1968). En trabajos realizados en Belice, Disney (1966) demostró que esta especie es la mas comunmente colectada usando como cebo roedores y esta observación condujo directamente a la incriminación de este flebótomo como el vector de *Leishmania mexicana*. Biagi et al., (1965) en Mexico y Disney (1968) en Belice, independientemente confirmaron el papel de este flebótomo como el vector de la leishmaniasis conocida como úlcera de los chicleros y

consideran esta especie antropofílica. *Lu. o. olmeca* ha sido reportada en México, Belice, Honduras, Guatemala (Fairchild & Theodor, 1971; Martins *et al.*, 1978) en Nicaragua y Costa Rica (Murillo & Zeledón, 1985).

Lutzomyia olmeca bicolor Fairchild & Theodor, 1971. Este flebotomino es probablemente el vector de *Leishmania aristidesi* encontrada en la rata arrocerera *Oryzomys capito* (Olfers, 1918), el conejo pintado *Cuniculus paca* (Linnaeus, 1766), la rata espinosa *Proechimys semispinosus* (Tomes, 1860), y en un marsupial, la zarigüeya murina *Marmosa robinsoni* Bangs, 1898, en Panamá (Herrer *et al.*, 1971). Hasta la fecha esta *leishmania* no ha sido encontrada infectando al hombre, pero es muy probable que en un futuro la infección humana sea diagnosticada (Lainson, 1983). *Lu. o. bicolor* fue descrita del Pantano de Mojinga, Provincia de Colón, Panamá, pero también ha sido reportada de Colombia, Ecuador, Costa Rica y Venezuela. (Young, 1979).

Lutzomyia olmeca nociva Young & Arias, 1982. Esta especie ha sido reportada de la región norte-central de Brasil. Es muy semejante a *Lu. flaviscutellata*, estas especies son morfológicamente diferenciables, siendo

simpátricas en el área de Manaus donde ambas han sido encontradas naturalmente infectadas por lo que se les incrimina como hospederos naturales de *Leishmania amazonensis*. Arias et al., (1987) encontraron que la tasa de infección de *Lu. o. nociva* era de 0.1% y de *Lu. flaviscutellata* era de 0.5%, pero la densidad poblacional de *Lu. o. nociva* era mas alta que la de *Lu. flaviscutellata*. Young y Arias (1982) relatan que *Lu. o. nociva* picaba al hombre mas frecuentemente que *Lu. flaviscutellata*. Basado en esta información, Arias et al. (1987) consideraron que ambas especies son igualmente importantes en la transmisión de *Leishmania amazonensis* al hombre. Hasta ahora *Lu. o. nociva* no ha sido reportada en otros lugares, pero es posible que otros especímenes de Amazonas identificados como *Lu. flaviscutellata* realmente sean *Lu. o. nociva* u otro miembro de este complejo.

Lutzomyia inornata Martins, Falcao & Da Silva, 1965. Esta especie poco conocida fué descrita de especímenes colectados en la Colonia Agrícola de Iata, Municipio de Guajará-Mirim, en el Estado de Rondonia, Brasil (Martins et al., 1965). Además del material originariamente colectado para la descripción de esta especie pocos son los registros de *Lu. inornata* en otras regiones y por lo tanto se considera rara y por ende dudoso vector de

Leishmania.

Lutzomyia reducia feliciangeli, Ramirez Perez & Ramirez, 1988. Fue recientemente descrita de material colectado en el Cerro La Neblina, Territorio Federal Amazonas, Venezuela. Hasta el momento no se han efectuado estudios con el fin de determinar la infección natural de esta especie.

3. La electroforesis de enzimas y su importancia.

La tecnica de electroforesis de enzimas es el procedimiento mas utilizado para el estudio de la variación genética de las poblaciones, siendo un método rápido y eficiente (Ayala, 1978). Permite evidenciar diferencias genéticas entre individuos, poblaciones y especies. Su uso involucra la determinación de la frecuencia alélica en los loci que codifican una enzima particular más que una simple comparación del número y posición de bandas enzimáticas sobre geles de poliacrilamida, almidón, agarosa, láminas de acetato de celulosa u otra sustancia gelatinosa que forme una matriz homogénea (Wagner & Selander, 1974).

Es un método sensible que detecta pequeñas diferencias en moléculas casi idénticas. Se basa en el conocimiento de que la secuencia de los aminoácidos en las proteínas se corresponden con la secuencia de los nucleótidos en el ADN de los genes estructurales, de modo, que el análisis de una proteína es para los fines practicos un análisis de los genes (Trebatoski & Haynes, 1969). Las diferencias mas fácilmente detectables por este método son sustituciones de aminoácidos que se traducen en una carga diferente en una molécula proteica, ya sea porque el

aminoácido sustituido porta la carga diferente o porque su sustitución resulta en un cambio en la configuración de la molécula y así hay en consecuencia un cambio en la carga neta debido a que se cubran o no grupos ionizables (Hubby & Throckmorton, 1965).

Las proteínas diferentes que constituyen un conjunto de isoenzimas, tienen propiedades enzimáticas similares pero no idénticas, ya que ellas pueden catalizar la misma reacción pero diferir en su estructura. Ellas pueden estar juntas en la misma célula, pero pueden haber también marcadas diferencias en patrones isoenzimáticos entre células de diferentes tejidos o en diferentes estadios del desarrollo. En la práctica las causas del origen de las isoenzimas se clasifican en tres categorías:

- a. La presencia de loci que codifican diferentes cadenas polipeptídicas de la enzima.
- b. La presencia de alelos múltiples en un locus, lo que determina la formación de cadenas polipeptídicas estructuralmente distintas.
- c. Las llamadas isoenzimas secundarias, son modificaciones secundarias de la estructura

proteica de la enzima que ocurre despues de la síntesis primaria de la cadena polipeptídica (Harris & Hopkinson, 1976).

Las isoenzimas son variantes genéticamente determinadas que pueden ser detectadas por migración diferencial en un campo electrico (Wagner & Selander, 1974), siendo éste el principio fundamental de la electroforesis. La tasa de migración depende de la carga electrica de la molécula de la enzima, de su peso molecular y la fuerza ejercida por el campo electrico sobre el gel (Harris & Hopkinson, 1976).

Diferentes poblaciones tienden a acumular genes diferentes (Ayala, 1975, Nei, 1975). Esta diferenciación de genes ocurre en las poblaciones ocasionada por mutaciones y recombinaciones, evolucionando por cambios en la frecuencia genética. A su vez ocasionada por la selección natural, el flujo de genes y la deriva genética al azar (Ayala, 1975, Futuyma, 1986).

La evidencia indica que grandes cantidades de variación genética existen en las poblaciones naturales. El grado de variación genética en una población puede ser

estimada solo si uno puede detectar variantes alélicas en genes que representen una muestra al azar del genoma total. Para muchos genes hay una correspondencia entre genotipo y fenotipo porque modifican ciertos rasgos morfológicos, pero en este caso solo unos pocos genes pueden ser estudiados, ya que las poblaciones naturales contienen mucha mas variación genética que la observada por inspección de los organismos. Esto puede ser probado por apareamientos entre individuos muy relacionados, lo que incrementa la probabilidad de homocigosis, es decir, la probabilidad de que un individuo porte dos copias idénticas del mismo gene. Así genes recesivos son expresados (Ayala, 1978). En resumen, las ventajas de la electroforesis son: es un método rápido y eficiente para estudios de genética de poblaciones; el fenotipo que observamos (electromorfos) tienen una correspondencia exacta con el genotipo de la población estudiada pudiendo detectar alelos recesivos que no son detectados en estudios morfológicos y permite un estimado directo del grado de divergencia genética entre especies sin tener que hacer cruces fértiles (Gottlieb, 1971).

En la electroforesis de enzimas, muestras de tejido de organismos pueden ser homogenizados para la liberación de las proteínas y enzimas. El homogenado es localizado en un soporte y este material con la muestra es sometido

a una corriente eléctrica por un tiempo dado. Cada proteína en el gel migra en una dirección específica y la tasa de migración depende de la carga eléctrica, del tamaño y del peso de la molécula enzimática. Después de remover el gel del campo eléctrico es tratado con sustancias químicas apropiadas que contienen un sustrato específico para la enzima correspondiente y una sal colorante que reacciona con el producto de la reacción enzimática que permite visualizar la posición de las bandas que representan la enzima estudiada.

Las enzimas presentan diferente movilidad electroforética lo que indica diferentes secuencias de aminoácidos. Para una enzima dada podemos encontrar variación en los patrones de bandeo (electromorfos) que pueden ser interpretados como variaciones en el Código Genético de un organismo. Algunos loci no presentan variación y solo se observa un solo alelo, son denominados "loci monomórficos", mientras que otros muestran mas de un alelo. Estos últimos son llamados "loci polimórficos".

En una corrida electroforética debemos determinar el alelo mas común y le damos la denominación de 100. Alelos que corran mas rápido tendrán valores por encima de 100 y

alelos que corran mas lentos tendrán valores por debajo de 100, basados en la migración relativa de los electromorfos con respecto al alelo mas común. Si los individuos presentan una sola banda inferimos que son homocigotas. Si el individuo presenta 2, 3, o 5 bandas (dependiendo de la estructura de la proteína) inferimos que es heterocigota.

Un locus puede tener 2 o mas alelos, cada alelo puede codificar para una versión estructuralmente igual, en este caso tendremos un individuo homocigota y así solo una forma de cadena polipeptídica será sintetizada. Si el individuo es heterocigota y tiene dos alelos diferentes formará dos cadenas polipeptídicas estructuralmente diferentes.

Hay enzimas monoméricas, formadas por una sola cadena polipeptídica, en este caso el patrón enzimático observado en el heterocigota representará una simple combinación de las dos formas que se presentan en cada uno de los correspondientes homocigotas.

Muchas enzimas son multímeros, es decir, están formadas por dos o mas subunidades o cadenas polipeptídicas, pudiendo ser dímeros, trímeros o

tetrámeros, etc. dependiendo del número de subunidades que la formen. Las subunidades de la isoenzima pueden tener idéntica frecuencia de aminoácidos (enzimas homoméricas) o pueden ser diferentes (enzimas heteroméricas). El patrón de isoenzimas primario observado después de la corrida electroforética depende en general del número de subunidades de la molécula de la isoenzima y del número de cadenas polipeptídicas estructuralmente diferentes que han sido sintetizadas.

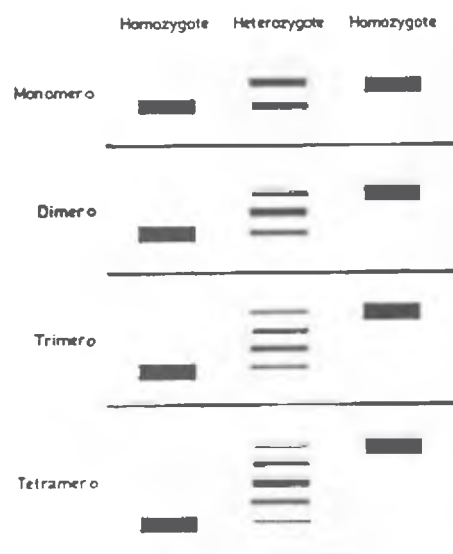
En el caso de enzimas multiméricas, en los heterocigotes las enzimas formadas serán heteroméricas híbridas. Las subunidades de las enzimas primarias que pueden ser generadas en tales heterocigotas varían de acuerdo al número de subunidades de las moléculas enzimáticas como puede verse en el siguiente cuadro:

	Monómeros	Dímeros	Trímeros	Tetrámeros
Homómeros	A	AA	AAA	AAAA
Heterómeros		AB	AAB ABB	AAAB AABB ABBB
Homómeros	B	BB	BBB	BBBB

En el caso de los dímeros habrán dos formas homoméricas y una heteromérica; en los trímeros hay dos

homoméricas y dos heteroméricas; en los tetrameros hay dos formas homoméricas y tres formas heteroméricas. En general el número de bandas de los individuos heterocigotas es uno mas que el número de subunidades que conforman la enzima.

Si los polipeptidos determinados por los dos alelos difieren en su carga neta, los heterocigotas presentarán un patrón electroforético característico de acuerdo a su estructura. Los monómeros presentarán dos componentes, los dímeros tres, los trimeros cuatro y así sucesivamente. En cada caso, los dos componentes externos del patrón representan las formas homoméricas y los componentes con movilidades electroforética intermedias, las formas heteroméricas.



Estos patrones son observados solo si las cadenas de polipeptidos determinados por los dos alelos contribuyen en igual proporción a la actividad enzimática y las subunidades se combinan al azar y sin restricción. En este caso la tasa de actividad de las enzimas primarias formadas será 1:1 para monómeros; 1:2:1 para dímeros; 1:3:3:1 para trimeros; 1:4:6:4:1 para tetrameros. En los dímeros el 50% del total de la actividad será debido a formas homoméricas, en los trimeros el 25% y en los tetrameros solo el 12.5%.

La variación genética así como la caracterización de una población puede ser estimada por la proporción de loci polimórficos (P), frecuencia alélica y niveles de heterocigocidad (H) (Wagner & Selander, 1974; Dobzhansky, *et al.*, 1977; Munstermann, 1979).

Consideraciones sobre el Código Genético y de las propiedades eléctricas de los aminoácidos sugieren que solo un tercio de los aminoácidos son detectables por electroforesis de enzimas. Consecuentemente la variación alélica es subestimada (Lewontin, 1974; Nei, 1975). Generalmente solo aquellos aminoácidos sustituidos que alteren la carga neta de la proteína cambiara su movilidad en un gel electroforético (Ayala, 1978).

Un locus es definido como polimórfico en una población cuando tiene dos o mas alelos con frecuencias desde moderada a alta (Ayala, 1974). Dos criterios son comunmente usados para decidir cuando un locus será considerado polimórfico (1) cuando la frecuencia alélica del alelo mas común no es mayor de 0.95 y (2) cuando no es mayor que 0.99. El primer criterio es mas restrictivo que el segundo puesto que un locus polimórfico para el primer criterio lo será también para el segundo, pero no viceversa (Dobzhansky, *et al.*, 1977).

El grado de heterocigocidad de una población puede ser expresada en diferentes formas. En las poblaciones que se aparean al azar la frecuencia esperada de heterocigotas (H) en un locus puede ser directamente calculadas de las frecuencias alélicas. Si hay n alelos con frecuencias $f_1, f_2, f_3, \dots, f_n$, la frecuencia esperada de homocigotos es simplemente $f_1^2 + f_2^2 + f_3^2 + \dots + f_n^2$. La frecuencia esperada de heterocigotos es $H = 1 - (f_1^2 + f_2^2 + f_3^2 + \dots + f_n^2)$. También podemos medir la heterocigosidad utilizando la frecuencia observada de los heterocigotas en vez de la frecuencia esperada. La frecuencia observada es calculada contando el número de individuos heterocigotas y dividiéndolo entre el número total de individuos en una muestra.

En una población en donde hay dos alelos la proporción de heterocigotas se obtiene resolviendo la ecuación $(a+b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ donde a^2 representa la proporción del homocigota "a" esperada (0.25), b^2 la proporción del homocigota "b" esperada (0.25) y $2ab$ la proporción de heterocigotas (0.5) que esperamos se presente en esa población. Si en la población hay tres alelos debemos resolver la ecuación $(a+b+c)^2 = a^2 + 2ab + 2ac + b^2 + 2bc + c^2$, donde los homocigotas tienen una proporción de 0.2 y los heterocigotas de 0.8. Si en la población hay cuatro alelos, la ecuación sería $(a+b+c+d)^2 = a^2 + 2ab + 2ac + 2ad + b^2 + 2bc + 2bd + c^2 + 2cd + d^2$ donde los homocigotas tendrán una proporción de 0.25 y los heterocigotas de 0.75.

La cantidad total de variación en una población también puede ser estimada calculando la frecuencia promedio de heterocigotos por locus, \bar{H} . Esta se obtiene simplemente promediando H de todos los loci muestreados. H puede ser expresado con su error estándar, el cual refleja la cantidad de heterogeneidad entre los loci muestreados.

La cantidad de variación genética observada por electroforesis en insectos y otros organismos es

generalmente muy grande, ya que esta varía de especie a especie. Veinte o mas loci han sido estudiados en mas de treinta especies de *Drosophila*, el promedio de heterocigocidad para estas especies es de 0.150. El promedio de heterocigocidad para muchos otros insectos es mas o menos de la misma magnitud. Entre las especies en las cuales veinte ó mas loci han sido estudiados, el grado mas grande de polimorfismo genético fué observado en poblaciones de un Coleoptera *Otiorrhynchus scaber* con un $H = 0.309$. Otros invertebrados tienen heterocigocidades comparables a aquellos observables en insectos. Sin embargo, los vertebrados son genéticamente menos polimorfos que los invertebrados, el promedio de heterocigocidad entre 66 especies de vertebrados bien estudiados es 0.060, menos de la mitad del promedio de heterocigocidad de los invertebrados. En el hombre, 61 loci genéticos han sido estudiados con un promedio de heterocigocidad de 0.067, el cual no es muy diferente del promedio de los vertebrados.

Si dos poblaciones están aisladas por razones geográficas o reproductivas, ambas tienden a acumular genes diferentes (Lewontin, 1974; Nei, 1975; Wallace, 1981). Dos especies muy relacionadas tienen muchos genes en común. Varios autores han propuesto diferentes medidas de distancia genética entre poblaciones, en muchas de

ellas, sin embargo no está claro qué unidad biológica están midiendo. Desde el punto de vista de la genética la medida apropiada para la estimación de la distancia genética es el número de nucleótidos o codones diferentes por unidad de longitud de ADN (Ayala, 1978).

La similaridad y diferenciación genética entre poblaciones son medidas mediante dos estadísticas. La Identidad Genética (I), la cual estima la proporción de genes que permanecen idénticos en las dos poblaciones y la Distancia Genética (D), la cual estima la proporción de sustitución de genes que han ocurrido durante el período de separación evolutiva de las dos poblaciones.

Se denomina distancia genética (D) al número acumulado de codones diferentes por locus. Se calcula mediante un método estadístico para la estimación de codones diferentes por gene y el tiempo de divergencia entre especies muy relacionadas (Nei, 1972).

La diferenciación de genes entre poblaciones es generalmente un proceso lento. Dos especies muy relacionadas por lo general tienen muchos genes en común. Pero para obtener un resultado mas confiable de D un gran número de genes debe ser examinado (Nei, 1975; Ayala, 1978).

La distancia genética entre razas es generalmente muy pequeña, estimados de distancia genética entre subespecies son generalmente mucho mas grandes que aquellas entre razas, siendo mayor entre especies que entre subespecies (Nei, 1975). Las diferencias genéticas medidas en términos de D entre especies gemelas son considerablemente mas pequeñas que entre otras especies muy relacionadas (Hubby & Trockmorton, 1968).

Puesto que el aislamiento reproductivo puede ser logrado por un número relativamente pequeño de sustituciones de genes, la distancia genética puede variar considerablemente entre diferentes especies. Por lo tanto las especies no pueden ser definidas en términos de distancia genética solamente. Sin embargo, esta es una medida de las relaciones evolutivas entre especies.

Un amplio rango de valores de distancia genética o similaridad genética para especies es esperada, puesto que las diferencias reflejan modificaciones que acompañan a la especiación y ocurren desde que la especiación comenzó (Wagner & Selander, 1974).

MATERIALES Y METODOS

Material biológico.

Poblaciones naturales de tres taxa del complejo *flaviscutellata* fueron utilizadas, dos procedentes de Brasil: *Lu. flaviscutellata* y *Lu. o. nociva*, especies simpátricas colectadas del Parque das Laranjeiras, Manaus, Estado de Amazonas. Estas colectas fueron realizadas en el periodo comprendido entre el 4 de febrero y el 6 de marzo de 1986 y *Lu. o. bicolor*, colectadas en Gamboa, al margen del Lago Gatún, Provincia de Panamá, colectadas durante el mes de agosto de 1987.

Método de colecta.

Los flebótomos fueron colectados mediante trampas Disney (Disney, 1966) modificadas, con aceite de castor, utilizando como cebo el cobayo (*Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758)). Las trampas fueron colocadas durante las últimas horas de la tarde y recogidas al amanecer. Los flebótomos fueron recogidos con ayuda de un estilete en el mismo lugar de la colecta y colocados en papel de filtro (Whatman #1) inmediatamente sin que hubiese contacto de uno con el

otro. Cada pedazo del papel de filtro con los flebótomos fueron colocados en viales de propioetileno e inmediatamente colocados en nitrógeno líquido (-196° Centígrados) para ser transportados y almacenados en el Laboratorio Gorgas en un congelador Revco a -56.6° Centígrados hasta el momento de la realización de los ensayos electroforéticos.

El material colectado en Brasil fué conservado en nitrógeno líquido en el Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia y posteriormente transportado a Panamá en hielo seco (-90° C) hasta el Laboratorio Gorgas donde fueron colocados en las mismas condiciones antes mencionadas.

Identificación de los flebótomos.

Considerando que las especies que conforman el complejo *flaviscutellata* poseen características morfológicas externas que las hacen fácilmente separables de las otras especies de flebótomos debido a su coloración torácica, la identificación inicial fué efectuada en el lugar de la colecta momentos antes de ser congelados, especialmente para *Lu. o. bicolor*, único miembro del complejo presente en Panamá. En el caso de

las especies brasileras debido a que *Lu. flaviscutellata* y *Lu. o. nociva* son simpátricas e imposible de diferenciar macroscópicamente, la identificación precisa se realizó en el laboratorio, para ello, la cabeza y los dos segmentos distales del abdomen fueron disectados y montados en láminas portaobjeto después de varios días de clarificación en fenol. La identificación se realizó conforme a los criterios morfológicos establecidos (Young & Arias, 1982).

Preparación de los homogenados

Especímenes seleccionados al azar fueron colocados en placas horadadas. Ocho individuos fueron homogenizados por cada corrida electroforética. La homogenización fue realizada por trituración de cada espécimen mediante la utilización de una varilla de vidrio en 5 μ l de solución amortiguadora específica para la enzima que se desea estudiar. La varilla de vidrio fue cuidadosamente limpiada entre un espécimen y otro para evitar la contaminación.

Ensayos electroforéticos.

La electroforesis se realizó mediante equipo Helena

Laboratories, Beaumont, Texas, utilizando como medio de soporte láminas de acetato de celulosa Titan III. Las soluciones buffer de las cámaras y coloración son dadas en el Cuadro I. Los sustratos y métodos de visualización de las reacciones enzimáticas utilizados son dadas en el Cuadro II y ya han sido utilizadas y descritas con anterioridad para el estudio de electroforesis en mosquitos y flebótomos obteniendo buenos resultados (Kreutzer, 1979; Kreutzer, et al., 1977; Kreutzer y Galindo, 1980; Petersen, 1982; 1985).

Los homogenados fueron colocados sobre las láminas de acetato de celulosa mediante un dispositivo del kit Helena Laboratories que permitió la aplicación de muestras de 8 especímenes simultáneamente sobre cada lámina. Inmediatamente las láminas fueron colocadas en las cámaras de corrida previamente preparadas con las soluciones buffer específicas para cada enzima y calibradas para el voltaje y tiempo necesarios en cada caso. Las condiciones de la corrida para cada enzima son señaladas en el Cuadro III. Finalizada la corrida las láminas fueron colocadas en placas de Petri contentivas del sustrato y reactivos reveladores de la enzima y mantenidas en estufa a 37° C. por un tiempo específico para cada una de ellas. Para detener la reacción las

Cuadro I SOLUCIONES BUFFER UTILIZADAS DURANTE EL PROCESO DE LA ELECTROFORESIS.

Sistema	Cámara	Coloración
Tris-ac. maleico- EDTA (1)	12.11 g MgCl 11.62 g ac. maleico 2.92 g EDTA 2.03 g MgCl ₂	3.64 g tris pH 8.0
Tris-fosfato (2)	6.050 g tris 6.050 g NaH ₂ PO ₄	0.02 g tris pH 7.5
Fosfato (3)	28.4 g Na ₂ HPO ₄ 24.0 g NaH ₂ PO ₄	3.64 g tris pH 8.0
Ac. cítrico trisodium (4)	38.7 g ac. cítrico 28.8 g NaH ₂ PO ₄	2.96 g NaH ₂ PO ₄ 11.96 g Na ₂ HPO ₄ pH 7.4

Cuadro II.-SUBSTRATOS Y METODOS DE VISUALIZACION DE LAS REACCIONES ENZIMATICAS OCURRIDAS DURANTE EL PROCESO DE LA ELECTROFORESIS.

Enzima	Substrato	Coenzima	Activadores Inhibidores	Método de visualización	Enzimas de unión.
PGM	Glucosa-1-P Glucosa-1-6-P	NADP	EDTA	MTT PMS AGAR	G6PDH
PGI	Fructosa-6-P	NADP	EDTA	MTT PMS AGAR	--
GPD	Glicero- fosfato	NAD	--	MTT PMS AGAR	--
ME	Ac. málico	TPN	---	MTT PMS AGAR	--
MDH	Ac. málico	NAD	MgCl ₂	MTT PMS AGAR	--
MPI	Manosa-6-P	NADP	MgCl ₂	MTT PMS AGAR	G6PDH GPI
HK	Glucosa ATP	TPN	MgCl ₂	MTT PMS AGAR	G6PDH
FK	Fructosa ATP	--	MgCl ₂	MTT PMS AGAR	Fosfo- glucosa isomerasa.
G6PDH	Glucosa-6-P	TPN	--	MTT PMS AGAR	--
ASAT	Ac. cetogluta- rico. Ac. aspártico	NADH	--	AGAR LUV.	Malato dehidroge- nasa.
ALAT	Ac. cetogluta- rico L. alanina	NADH	--	MTT PGM AGAR	Lactato dehidroge- nasa.
Fosf. ácida.	Ac. naftol fosfórico	--	--	F. Garnet AGAR	--

Cuadro III CONDICIONES DE LA CORRIDA ELECTROFORETICA
PARA CADA ENZIMA.

Enzima	Buffer de la camara.	V/t	Buffer de la coloracion
PGM	1	180/15'	1
PGI	1	180/15'	1
GPD	1	200/15'	1
ME	1	160/15'	1
MDH	1	180/15'	1
MPI	2	160/15'	2
Fk	3	150/15'	3
HK	1	200/15'	1
ALAT	3	160/10'	
ASAT	4	150/15'	4
G6PDH	3	150/15'	3
FOSFATASA ACIDA	4	160/20'	Ac. citrico Citrato de Na.

láminas de acetato de celulosa fueron fijadas en agua y ácido acético en una proporción del 5%.

Las enzimas estudiadas, su abreviatura y el número de la Comisión de Enzimas (E.C.) fueron las siguientes:

Fosfoglucomutasa	PGM	E.C. 2.7.5.1
Glucofosfato isomerasa	PGI	E.C. 5.3.1.9
Enzima málica	ME	E.C. 1.1.1.40
Hexoquinasa	Hk	E.C. 2.7.1.1
Manosa fosfato isomerasa	MPI	E.C. 5.3.1.8
Malato deshidrogenasa	MDH	E.C. 1.1.1.37
Glicerofosfato deshidrogenasa	GPD	E.C. 1.1.1.8
Fructoquinasa	Fk	E.C. 2.7.1.11
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6PDH	E.C. 1.1.1.49
Aspartato aminotransferasa	ASAT	E.C. 2.6.1.1
Alanina aminotransaminasa	ALAT	E.C. 2.6.1.2

Análisis de datos.

Las frecuencias alélicas fueron analizadas por medio de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg y evaluadas por una prueba de chi-cuadrado (χ^2) como prueba de bondad de ajuste.

Para calcular la identidad y la distancia genética fué utilizado el método de Nei (1972). Para ello fué utilizado el programa para computadoras personales y elaborado por Paul W. Sattler y Larry R. Hillburn publicado en The Journal of Heredity 76: 400 (1985). Este programa incorpora las modificaciones de la forma original para muestras de pequeño tamaño, reduce el sesgo resultante de tasas desiguales de sustituciones de aminoácidos y reduce el sesgo por muestreo de un pequeño número de loci. Tiene la limitante que dos grupos de poblaciones deben ser analizadas para determinar si el promedio de divergencia genética entre grupos es significativamente mas grande que el promedio de distancia genética entre grupos.

RESULTADOS

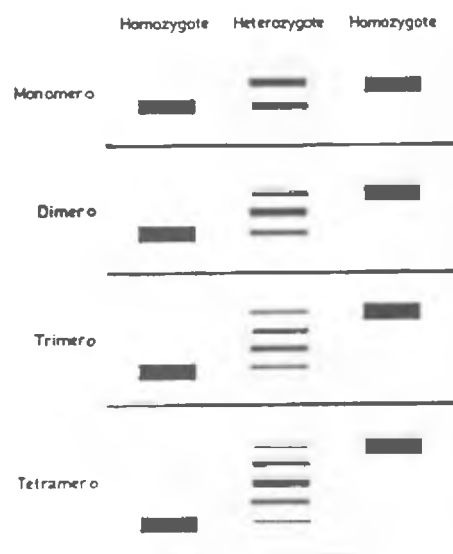
Un total de 11 enzimas fueron estudiadas, ocho mostraron actividad, siendo bien manifiesta en ocho de ellas: PGM, PGI, GPD, HK, ME, MDH, MPI, Y G-6-PDH. Tres no mostraron actividad: ASAT, ALAT y FK. La información obtenida en este estudio para cada una de las enzimas que mostraron actividad se dá a continuación, haciendo referencia al número de alelos por locus, estructura cuaternaria deducida de las observaciones, grado de actividad, polimorfismo y heterocigocidad para cada locus. Esta información también puede verse en los cuadros IV, V, VI, VII y VIII.

Fosfoglucomutasa (PGM).

La actividad de esta enzima fué marcada y expresada por un solo locus (Figura III). En todas las especies estudiadas hubo polimorfismo, observándose cuatro alelos para *Lu. o. bicolor* y *Lu. o. nociva* y tres para *Lu. flaviscutellata*. Se observaron formas heterocigotas de donde se infiere que la estructura cuaternaria de la enzima es monomérica. La proporción de heterocigocidad es

homoméricas y dos heteroméricas; en los tetrameros hay dos formas homoméricas y tres formas heteroméricas. En general el número de bandas de los individuos heterocigotas es uno mas que el número de subunidades que conforman la enzima.

Si los polipeptidos determinados por los dos alelos difieren en su carga neta, los heterocigotas presentarán un patrón electroforético característico de acuerdo a su estructura. Los monómeros presentarán dos componentes, los dímeros tres, los trimeros cuatro y así sucesivamente. En cada caso, los dos componentes externos del patrón representan las formas homoméricas y los componentes con movilidades electroforética intermedias, las formas heteroméricas.



variable según la especie. *Lu. o. bicolor* fué la especie que presentó menor proporción de heterocigocidad.

Glucofosfato isomerasa (PGI).

Mostró marcada actividad. se observaron dos alelos bien definidos (Figura III). Las formas heterocigotas presentaron el patrón característico de las enzimas dimericas. En esta enzima *Lu. o. bicolor* presentó un 65% de heterocigosidad el mas alto para las tres especies.

Glicerofosfato deshidrogenasa (GPD).

Se observó marcada actividad para dos alelos (Figura III), con excepción de *Lu. o. bicolor* que presentó el alelo 100 fijo en todas las muestras analizadas. En ninguna especie se observaron formas heterocigotas.

Enzima málica (ME).

Hay evidencia de dos loci Me-1 y Me-2 (Figura III). Me-1, monomórfico, no observándose ninguna diferenciación entre especies y Me-2, polimórfico. El análisis detallado de este locus fué imposible de realizar debido a la poca distancia de separación entre las bandas lo que no permitió una clara diferenciación entre alelos

aparentemente diferentes ni evidenciar la presencia de formas heterocigotas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Ward et al. (1981) para esta enzima en flebótomos de Francia y Túnez.

Hexoquinasa (HK).

La actividad fué moderada, pero siempre dando evidencias de ser monomórfica para el mismo alelo en las tres especies estudiadas. No se observaron formas heterocigotas.

Malato deshidrogenasa (MDH).

Se evidenciaron dos loci (Figura IV). En ambos se observó un polimorfismo difícil de determinar debido a la pequeña distancia entre las bandas presentes en las placas. No se observaron formas heterocigotas. Esta molécula ha sido reportada con estructura dimérica (Harris y Hopkinson, 1976).

Manosa fosfato isomerasa (MPI).

Enzima con buena actividad para un solo locus, el cual se manifestó muy polimórfico con cuatro alelos bien definidos (Figura IV). Se observan formas heterocigotas con el patrón característico de las formas monoméricas. Datos de esta enzima se obtuvieron solo para *L. o. bicolor*. Para las otras especies los datos son

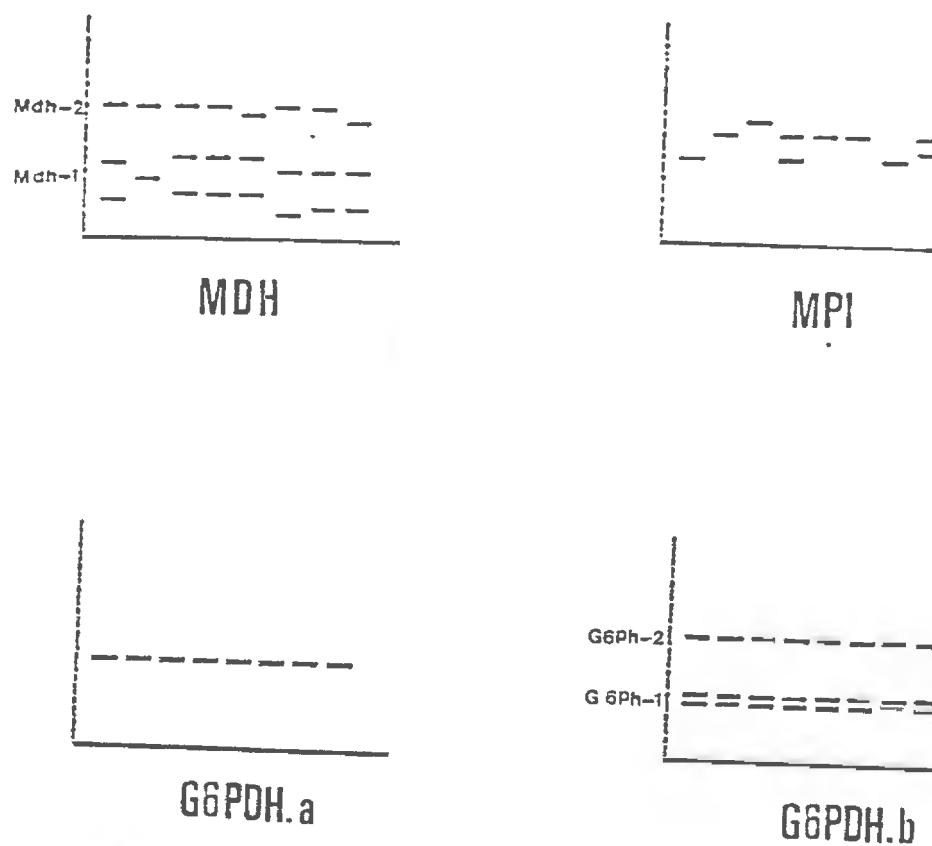


Figura IV.

MDH. Se evidenciaron dos loci: MDH-1 altamente polimórfico y Mdh-2 moderadamente polimórfico.

MPI. Presencia de cuatro alelos. Enzima altamente polimórfica.

G-6-PDH.a. Individuos monomórficos.

G-6-PDH.b. Individuos con evidencia de 2 loci.

insuficientes por lo que no pudieron ser utilizados para la determinación de la Distancia Genética entre especies.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Esta enzima mostró marcada actividad. Solo se obtuvo información para *Lu. o. bicolor*. Treinta y dos especímenes mostraron actividad para un locus, monomórfico y ocho mostraron actividad para dos loci (Figura IV).

El Cuadro IV hace un resumen de los datos obtenidos, cuando las enzimas de las tres especies en estudio son comparadas. La estructura de las enzimas fué inferida del patrón heterocigoto. Por ejemplo, PGM mostró el patrón característico de dos bandas de las formas monoméricas. PGI presentó el patrón de tres bandas de las formas diméricas.

El Cuadro V muestra el número de individuos y la frecuencia de genotipos observados en tres loci polimórficos (PGM, PGI, GPD) para las tres especies en estudio. Estas frecuencias fueron analizadas por medio de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg y evaluadas por la prueba de chi-cuadrado (χ^2) como prueba de bondad de ajuste. Las comparaciones fueron hechas a partir del

Cuadro IV CARACTERISTICAS DE 13 LOCI ESTUDIADOS CUANDO LOS DATOS DE *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata* SON CONSIDERADOS EN CONJUNTO.

Locus enzimático	Estado	# alelos	estructura cuaternaria.	n
PGM ¹	polimórfico	4	monomérica	98
PGI ²	polimórfico	2	dimérica	108
GPD	polimórfico	2	?	121
ME-1	monomórfico	1	?	126
ME-2	polimórfico	?	?	126
MDH-1	polimórfico	?	?	98
MDH-2	polimórfico	?	?	98
MPI ³	polimórfico	3	monomérica	55
HK	monomórfica	1	?	97
PK ⁴	---	---	---	53
ALAT ⁴	---	---	---	---
ASAT ⁴	---	---	---	---
FOSFATASA ACIDA ³	monomórfica	1	?	8

¹.-*Lu. flaviscutellata* presentó 3 alelos.

².-*Lu. o. bicolor* presentó un alelo fijo.

³.-Información obtenida solo para *Lu. o. bicolor*.

⁴.-Estas enzimas no mostraron actividad.

Cuadro V. NUMERO DE INDIVIDUOS OBSERVADOS EN CADA GENOTIPO EN 3 LOCI POLIMORFICOS PARA *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata*.

Fenotipos	<i>Lu.</i> <i>olmeca</i> <i>bicolor</i>	<i>Lu.</i> <i>olmeca</i> <i>nociva</i>	<i>Lu.</i> <i>flaviscutellata</i>
Pgm 130/130	0	0	0
Pgm 130/120	0	6	0
Pgm 130/100	1	1	0
Pgm 130/86	0	0	0
Pgm 120/120	0	7	1
Pgm 120/100	1	3	4
Pgm 120/86	0	0	0
Pgm 100/100	35	5	4
Pgm 100/86	6	2	3
Pgm 86/86	2	1	0
	$\chi^2=4.906$	$\chi^2=16.25^*$	$\chi^2=7.987$
Pgi 116/116	5	17	7
Pgi 116/100	26	5	3
Pgi 100/100	9	5	10
	$\chi^2=3.921^*$	$\chi^2=7.822^*$	$\chi^2=8.386^*$
Gpd 120/120	0	34	4
Gpd 120/100	0	0	0
Gpd 100/100	47	3	13
		$\chi^2=37.18^*$	$\chi^2=17.043^*$

*: desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg.

número observado en cada genotipo con el número esperado obtenido de la multiplicación del factor correspondiente a cada genotipo por el número de individuos en la muestra. Los grados de libertad para el análisis de χ^2 fueron obtenidos restando del número de alelos del número de genotipos. Se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones esperadas y las observadas con excepción de las poblaciones de *Lu. o. bicolor* y *Lu. flaviscutellata* cuando fueron analizadas para la enzima PGM.

El Cuadro VI muestra la frecuencia alélica y la heterocigosidad observada (h) para los loci analizados en las tres especies en estudio.

La heterocigosidad observada es la proporción de individuos heterocigotas observados para cada especie por locus y la heterocigosidad promedio fué obtenida dividiendo el promedio de los valores de heterocigosidad por locus para cada especie, entre el número de loci totales, tanto monomórficos como polimórficos; para calcular estos valores fueron considerados cuatro loci, tres polimórficos (PGM, PGI y GPD) y uno monomórfico (HK) (Cuadro VII).

Cuadro VI. FRECUENCIA ALELICA DE TRES LOCI PARA TRES ESPECIES DEL COMPLEJO *flaviscutellata*.

Loci	<i>Lu. o. bicolor</i>	<i>Lu. nociva</i>	<i>Lu flaviscutellata</i>
Pgm ¹³⁰	0.011	0.14	0
Pgm ¹²⁰	0.011	0.46	0.25
Pgm ¹⁰⁰	0.867	0.32	0.625
Pgm ⁸⁶	0.111	0.08	0.125
h=	0.177	0.480	0.583
n=	45	25	12
Pgi ¹¹⁴	0.45	0.722	0.425
Pgi ¹⁰⁰	0.55	0.278	0.575
h=	0.65	0.185	0.15
n =	40	27	20
Gpd ¹⁰⁰	0	0.919	0.235
Gpd ¹⁰⁰	1.0	0.081	0.765
h=	0.00	0.00	0.00
n =	47	37	17

n= número de especímenes.

h= heterocigosidad observada para cada locus.

La proporción de heterocigosidad observada fue comparada con la proporción de heterocigosidad esperada para una población en equilibrio, los valores observados se desviaron de los valores esperados (Cuadro VII). La proporción de individuos heterocigotas esperada fue calculada mediante la fórmula $1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia alélica para cada locus.

Los valores de identidad (I) y distancia genética (D) obtenidos para estas especies es dado en el Cuadro VIII.

Cuadro VII HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA, ESPERADA Y HETEROCIGOSIDAD PROMEDIO PARA 3 LOCI EN *Lu. o. bicolor*, *Lu. o. nociva* y *Lu. flaviscutellata*.

	Loci	Heterocigosidad		
		observada	esperada	promedio*
<i>Lu. o. bicolor</i>	PGM	0.177	0.235	0.206
	PGI	0.650	0.495	
	GPD	0.	0.	
<i>Lu. o. nociva</i>	PGM	0.480	0.66	0.153
	PGI	0.185	0.401	
	GPD	0.	0.148	
<i>Lu. flaviscutellata</i>	PGM	0.583	0.531	0.183
	PGI	0.150	0.488	
	GPD	0.	0.359	

* Calculada para cuatro loci, tres polimórficos (PGM, PGI, GPD) y uno monomórfico (HK).

Cuadro VIII IDENTIDAD Y DISTANCIA GENETICA CALCULADA POR EL METODO DE NEI PARA TRES MIEMBROS DEL COMPLEJO *flaviscutellata*.

	Identidad (I)	Distancia (D)
<i>Lu. o. bicolor</i> - <i>Lu. o. nociva</i>	0.571	0.559
<i>Lu. o. bicolor</i> - <i>Lu. flaviscutellata</i>	0.979	0.021
<i>Lu. o. nociva</i> - <i>Lu. flaviscutellata</i>	0.711	0.340

DISCUSION

Durante el desarrollo de este estudio fueron analizadas tres enzimas PGM, PGI y GPD debido a que fueron las enzimas de las 11 utilizadas que suministraron información que permitiera tratar de establecer el grado de variabilidad (heterocigosidad y polimorfismo) y el grado de divergencia (identidad y distancia genética) de *Lu. olmeca bicolor* de Gamboa, Panamá, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata*, dos especies simpátricas de Manaus, Brasil, vectores de leishmaniasis cutánea.

Las frecuencias alélicas de los tres loci fueron sometidos a la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg. Para PGM las poblaciones de *Lu. o. bicolor* y *Lu. flaviscutellata* tienden a estar en equilibrio. Pero, para PGI y GPD las poblaciones de las tres especies mostraron diferencias significativas entre el número de individuos observados y los esperados en cada genotipo (Cuadro V). Los alelos en las poblaciones naturales rara vez o nunca presentan la misma frecuencia, sin embargo, se espera que mantengan una frecuencia relativa entre ellos, éste equilibrio es mantenido por el apareamiento al azar. Para

GPD no se observaron formas heterocigotas para ninguna de las tres especies en estudio, esta deficiencia puede ser debida a fenómenos tales como el efecto Wahlund por agrupación de poblaciones genéticamente diferentes donde no hay intercambio genético, es decir, son poblaciones reproductivamente aisladas por lo que se producen desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg.

También es posible que las desviaciones entre las frecuencias observadas y las esperadas para cada uno de los genotipos se deban a la selección natural en el caso de que existan dos poblaciones con características genéticas diferentes, a la presencia de genes letales recesivos que conduzcan a la eliminación de genotipos (en este caso homocigotas) que los porten y en consecuencia predominio del genotipo sobreviviente, a flujo genético por migración, a mutaciones diferenciales, a la presencia de alelos nulos, ya que, heterocigotas con alelos nulos presumiblemente solo muestran una banda y son evaluados como homocigotas, pero también pueden ocurrir errores en la identificación e interpretación de los alelos observados, en este último caso los errores serían en el

momento de determinar la migración relativa de los homocigotas y no así de los heterocigotas, cuya estructura es generalmente bien identificable.

Es importante señalar que para la caracterización genética de una población el tamaño de la muestra no es un factor que altere los resultados de una manera significativa, por el contrario, el número de loci estudiados sí influye notablemente en los resultados obtenidos, recomendándose el estudio de un número no menor de 20 loci (Nei y Roychoudhury, 1974; Ayala, 1975; Gorman y Renzy, 1979). Pero ciertamente cuando el tamaño de la muestra aumenta, la probabilidad de detectar alelos de baja frecuencia también aumenta.

A pesar de que en este estudio solo pudieron ser analizados tres loci se intenta hacer un análisis en cuanto a la variabilidad genética de las tres especies estudiadas.

En el Cuadro VI observamos que hay diferencias en la frecuencia alélica para PGM entre las tres especies; para PGI la frecuencia alélica de *Lu. o. bicolor* y de *Lu. flaviscutellata* son semejantes, pero difieren de *Lu. o. nociva*. Patrón que tiende a presentarse en GPD, con la

La heterocigosidad observada en estas tres especies (Cuadro VII) están fuera del rango típico observado para

Solo cuatro loci G6M, PGI, GPD y HK fueron tomados en cuenta para calcular la heterocigosidad promedio (H) por especies, por lo tanto, los valores obtenidos solo tienen validez para ellas y no deben ser entendidos como representativos de la estructura genética de la población en tanto no se muestreen mayor número de loci.

comparación con las otras dos especies en estudio. el número de especímenes analizados fue reducido en *flaviscutellata* para PGM presenta solo tres alelos, pero especies están geográficamente separadas. *Lu. o. bicolor*. Esto es de esperarse ya que estas *Lu. o. nociva* y *Lu. flaviscutellata* que entre esta última Esto podría sugerir una mayor divergencia genética entre frecuencia alélica difieren de las otras dos especies. las otras especies para cada locus, los valores de casi siempre presenta un número de alelos igual que el de frecuencias alélicas, mientras que *Lu. o. nociva* aunque con especies que muestran pocas diferencias en sus *Lu. o. bicolor* de Panamá y *Lu. flaviscutellata* de Brasil hijo Gpd¹⁰⁰. De estas observaciones se puede apreciar que salvedad de que en *Lu. o. bicolor* se presenta un alelo

insectos y los reportados por Caillard et al. (1986) para *Psychodopygus carrerai* y *Ps. yucumensis* de Bolivia debido a que solo fueron calculados para cuatro enzimas, siendo tres de éstas polimórficas, por lo tanto, estos valores pueden bajar cuando un número mayor de loci sean estudiados y mayor número de enzimas monomórficas incluídas.

La distancia genética entre *Lu. o. bicolor* y *Lu. flaviscutellata* es de 0.021 y la identidad es de 0.979. Estas dos especies tienen una distribución definida encontrándose geográficamente aisladas una de otra. Sus frecuencias alélicas son similares, lo que puede esperarse, ya que la adquisición de aislamiento reproductivo no requiere de cambios en una alta proporción del genoma (Dozhansky, et al , 1977).

La distancia genética entre *Lu. o. nociva* y *Lu. flaviscutellata* es de 0.340 y la identidad es de 0.711, estos valores al igual que las frecuencias alélicas de estas especies nos indican que existe cierto grado de diferenciación genética dando evidencias de que existen restricciones en el flujo de genes, pero no hay evidencias de barreras de aislamiento reproductivo entre

ellas. El concepto de especiación simpátrica es controversial entre los geneticistas de poblaciones, esencialmente consiste en la formación de especies, si una barrera biológica de aislamiento reproductivo se levanta en una población panmictica, sin ninguna separación geográfica de las especies incipientes. La pregunta de cuanta diferenciación genética es necesaria en el proceso de especiación es el problema cardinal de los procesos evolutivos (Ayala, 1975) aún no resuelto, el aislamiento reproductivo entre especies muy relacionadas es usualmente atribuido no a un solo locus genético sino a varios o muchos. La mayor parte de la especiación simpátrica debe ser gradual y así barreras inicialmente incompletas al flujo de genes se hace progresivamente mas efectiva (Futuyma, 1986). Si esto puede o no ocurrir en una población que se cruza ha sido fuertemente debatido (Futuyma, 1986).

Sin embargo, debo señalar que ninguno de los 11 loci estudiados fué diagnóstico por lo que con estos resultados no es posible una separación de especies. Es necesario analizar un número mayor de enzimas y hacer un muestreo mas amplio geográficamente de cada una de las especies, logrando de esta manera una visión mas ajustada

a las verdaderas características genéticas de las especies estudiadas.

CONCLUSIONES

- 1.-De los 11 loci estudiados, ocho presentaron buena resolución: PGM, PGI, ME, MDH, MPI, G-6-PDH, Fk y fosfatasa ácida; PGM, PGI y GPD dieron información útil para el análisis de variabilidad y distancia genética. ASAT, ALAT y FK no mostraron actividad.
- 2.-La heterocigosidad promedio (\bar{H}) calculada para las tres especies en estudio están por encima de los valores obtenidos en flebótomos y otros invertebrados, pero para el cálculo solo fueron tomados en cuenta cuatro loci.
- 3.-No hubo evidencias de loci diagnósticos en los sistemas enzimáticos estudiados, por lo tanto no es posible hacer una separación de especies mediante los datos obtenidos.
- 4.-Los valores de distancia (D) e identidad genética (I), así como los de frecuencias alélicas indican poca divergencia genética entre *Lu. o. bicolor* y *Lu. flaviscutellata*. También hay evidencias de intercambio genético entre *Lu. flaviscutellata* y *Lu. o. nociva*.

RECOMENDACIONES

- 1.-El complejo *flaviscutellata* incluye seis especies de las cuales cuatro son vectores de leishmanias del subgénero *Leishmania*, esto hace que sea un conjunto de especies que deban ser estudiados con mayor profundidad desde el punto de vista genético, en especial las especies simpátricas.
- 2.-En estudios posteriores se deben analizar mayor número de loci, puesto que esto da mayor oportunidad para detectar los cambios genéticos ocurridos durante el proceso evolutivo y de especiación.
- 3.-En trabajos futuros se sugiere hacer un muestreo más amplio geográficamente a fin de conocer la variabilidad genética intraespecífica y una vez caracterizadas en toda su extensión geográfica hacer la comparación interespecífica, con la elaboración de un dendrograma a fin de establecer las relaciones filogenéticas entre las diversas especies.

4.-Algunas enzimas que fueron incluidas en este estudio no pudieron ser analizadas por problemas en la separación de las bandas, por lo tanto se recomienda la utilización de otros buffers, diferentes pH y realizar experimentos de termopstabilidad para tratar de mejorar la resolución de las bandas haciendo posible su interpretación genética.

5.-Establecer colonias fundamentalmente de *Lu. flaviscutellata* y *Lu. o. nociva* e intentar cruces a fin de analizar la viabilidad y fertilidad de f_1 , en el caso de que sea obtenida.

LITERATURA CITADA.

- Arias, J.R. & R.D. Naiff. 1981. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76: 279-286.
- Arias, J.R., R.A. Freitas, R.D. Naiff & T.V. Barrett. 1987. Observations on the parasite *Leishmania mexicana* and its natural infection of the sand fly *Lutzomyia olmeca nociva*. *PAHO Bulletin*. 21: 48-55.
- Ayala, F.J. 1974. Biological evolution: natural selection or random walk?. *Amer. Scien.* 62: 692-701.
- Ayala, F.J. 1975. Genetic differentiation during the speciation process. In: *Evolutionary Biology* Vol. 8: 1-78.
- Ayala, F.J. 1978. Chemical genetics and evolution. In: *Biochemistry of Insects*. Morris Rockstein Ed., Academic Press, New York, San Francisco, London. 579-616 pp.
- Barker, D.C. & J. Butcher. 1983. The use of DNA probes in the indication of leishmaniasis: Discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* complexes. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 77: 285-297.
- Barretto, M. P. 1962. Nova subgêneros de *Lutzomyia* Franca, 1924 (Psychodidae, subfamilia Phlebotominae). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 4: 91- 100.
- Biagi, F.F. 1953. Algunos comentarios sobre la leishmaniasis y sus agentes etiológicos. *Leishmania trópica mexicana*, nueva subespecie. *Medicina* 33:401-406.

- Biagi, F.F., A.M. de Biagi, & H.F. Beltran. 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. *Prensa Med. Mex.* 30: 267-272.
- Bonfante-Garrido, R. 1982. Observaciones sobre *Leishmania mexicana venezuelensis*. *Proceeding of the 3rd-Venezuelan Congress of Microbiology and Symposium on Leishmaniasis*. Barquisimeto, Venezuela. Documento mimeografiado.
- Bonfante-Garrido, R. 1983. Leishmanias y Leishmaniasis tegumentaria en América Latina. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 95: 418-426.
- Bonfante-Garrido, R. & T. Barreto. 1981. Leishmaniasis tegumentaria americana en el distrito Urdaneta, Venezuela. *Bull. P.A.H.O.* 91: 30-38.
- Bonfante-Garrido, R., N. Morillo, A.R. Torres & N. Reco-Pardo. 1973. Leishmaniasis tegumentaria americana en Venezuela. *Bull. P.A.H.O.* 74: 166-175.
- Caillard, T., M. Tibayrenc, F. Le Pont, J. Dujardin, P. Desjeux & F.J. Ayala. 1986. Diagnosis by isozyme methods of two cryptic species, *Psychodopygus carrerai* and *Psychodopygus yucumensis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 23: 489-492.
- Castellanos, P.L. 1988. Comunicación personal.
- Chance, M.L. 1976. DNA relationships in the genus *Leishmania*. In: *Biochemistry of parasites and hosts parasites relationships*. Van der Bossche Ed. Biomedical Press, Amsterdam. 229-235 pp.
- Chance, M.L. 1979. The identification of *Leishmania*. In: *Problems in the identification of parasites and their vectors*. Taylor, A.K. and Muller, R. Eds. Blackwell. Oxford. 55-74 pp.

- Chance, M.L.; W. Peters & L. Shchory. 1974. Biochemical taxonomic of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 68: 307-325.
- Disney, R.H.L. 1966. A trap of phlebotomine sand flies attracted to rats. *Bull. Ent. Res.* 56: 445-451.
- Disney, R.H.L. 1968. Observations on a zoonosis: Leishmaniasis in British Honduras. *J. Appl. Ecol.* 5: 1-59.
- Dobzhansky, T., F. J. Ayala, G. L. Stebbins, J. W. Valentine. 1977. *Evolution*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 572 pp.
- Fairchild, G. B. & O. Theodor. 1971. On *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) and *Lutzomyia olmeca* (Diaz-Najera) (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 8: 153-159.
- Feliciangeli, D., J. Ramirez Perez & A. Ramirez. 1988. The phlebotominae sandflies of Venezuelan Amazonia. *Med. Vet. Entomol.* 2: 47-65.
- Floch, H. 1957. Epidémiologie de la leishmaniose forestière américaine en Guyane Française. *Revista di Malariaologia.* 36: 233-242.
- Forattini, O.P. 1973. *Entomologia médica*. Vol. 4 Editora da Universidade do Sao Paulo. Brasil. 657 pp.
- Forattini, O.P. & M.R. Santos. 1955. Novas observacoes em regioes endemicas de leishmaniose tegumentar americana nos Estados de Sao Paulo e Matto Grosso, Brasil. *Revta. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo.* 13: 13-20.
- Futuyma, D.J. 1986. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, INC. Publishers. Sunderland, Mass. 600 pp.

- Gardener, P.J. 1980. Polyacrilamide and starch gel techniques for isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates. In: *Biochemical Characterization of Leishmania*. Chance & Walton Eds. U.N.D.P. WORLD BANK WHO.
- Garnham, P.C. & D.J. Lewis. 1959. Parasites of British Honduras with special reference to leishmaniasis. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 53: 12-40.
- Gorman G. & J. Renzi. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: effects of sample size. *Copeia* 2: 242-249.
- Gottlieb, L.D. 1971. Gel electrophoresis; new approach to the study of evolution. *Bio. Science* 21: 939-946.
- Harris, H. & D.A. Hopkinson. 1976. *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*. North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Herrer, A, S.R. Telford, & H.A. Christensen. 1971. Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. I. Investigation of the infection among forest mammals. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 65: 349-358.
- Hubby J.L. & L.H. Trockmorton. 1965. Protein differences in *Drosophila* II. Comparative species and evolutionary problems. *Genetics*. 52: 203-215.
- Hubby J.L. & L.H. Trockmorton. 1968. Protein differences in *Drosophila* IV. A study of sibling species. *Am. Naturalist*. 102: 193-205.
- Killick-Kendrick, R. & R. Ward. 1981. Ecology of *Leishmania*. *Parasitology*. 82: 143-152.
- Kreutzer, R.D. 1979. Esterase isozymes in the mosquito *Culex (Melanoconion) erraticus*. *Mosquito News* 39: 500-505.

- Kreutzer, R.D. & P. Galindo. 1980. Isozyme studies of two *Melanoconion* mosquitoes, *Culex ocossa* and *Culex Panocossa*. *Mosquito News* 40: 605-613.
- Kreutzer, R.D., F.T. Posey & P.A. Brown. 1977. A fast and sensitive procedure for identifying genetics variants of phosphoglucumutase in certain genera of mosquitoes. *Mosquito News* 39: 407-409.
- Lainson, R. 1983. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 77: 569-596.
- Lainson, R. 1988. The Wellcome Unit N° 1: twenty-one years of contributions in the field of tropical parasitology. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 82: 27-32.
- Lainson, R. & J.J. Shaw. 1968. Leishmaniasis in Brasil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis. Incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazon Basin. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 62: 385-395.
- Lainson, R. & J.J. Shaw. 1970. Leishmaniasis in Brasil. V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Matto Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 64: 654-667.
- Lainson, R. & J.J. Shaw. 1972. Leishmaniasis in the New World: Taxonomic problems. *Br. Med. Bull.* 28: 44-48.
- Lainson, R. & J.J. Shaw. 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: *Biology of Kinetoplastida* Vol. 2. W.H.R. Lumsden and D. Evans (Editors). London and New York. Academic Press, 1-116 pp.

- Lainson, R. & J.J. Shaw. 1987. Ecology and epidemiology: New World. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol.1, Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (editors). London Academic Press, 291-343 pp.
- Lewontin, R.C. 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia Univ. Press. New York. 346 pp.
- Marinkelle, C.J. 1980. The control of leishmaniasis. *Bull. WHO*. 58: 807-818.
- Martins, A.V., A.L. Falcao & J.E. Da Silva. 1965. Notas sobre os flebotomos do territorio de Rondonia, com a descricao de seis especies novas (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 25: 1-20.
- Martins, A.V., P. Williams & A.L. Falcao. 1978. *American Sand Flies*. (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) Academia brasileira de Ciencias. Rio de Janeiro. 195 pp.
- McMahon-Pratt, D. & J. David. 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*. 291: 581-583.
- Medina, R. & J. Romero. 1959. Estudio clínico parasitológico de una nueva cepa de *Leishmania*. *Arch. Venez. Pat. Trop. Parasitol. Med.* 3: 298-326.
- Miles, M.A. & R.D. Ward. 1978. Preliminary isoenzyme studies on phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann. trop. Med. Parasitol.* 72: 398-399.
- Moulyneux, D.H. & R.W. Ashford. 1983. *The biology of Trypanosoma and Leishmania Parasites of man and domestic animals*. Taylor and Francis Eds. London. 292 pp.
- Munstermann, L. 1979. Isozymes of *Aedes aegypti*: phenotypes, linkage and use in the genetics analysis of sympatric subspecies populations in East Africa. Thesis Ph. D. Univ. Notre Dame. 176 pp.

- Murillo J. & R. Zeledón. 1985. *Flebotomos de Costa Rica (Diptera: Psychodidae)*. In: *Brenesia*. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1975. *Molecular Population Genetics and Evolution*. North, Holland Publishing Co. Amsterdam. 288 pp.
- Nei, M. & A. Roychoudhury. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetics distance. *Genetics*. 76: 379-390.
- Petersen, J.L. 1982. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by acetate electrophoresis. In: *New approaches to the identification of parasites and their vectors*. Tropical Diseases Research. Serie 5. W.H.O.
- Petersen, J.L. 1985. TDR Progress Report. Documento sin publicar.
- Petersen, J.L., C. Johnson, A. M. de Vasquez & R. Saenz. 1988. Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania mexicana amazonensis* en Panamá. *Rev. Med. Panamá*. 12: 158-164.
- Pressat, A. 1905. Le paludisme et les moustiques (Prophylaxie). Paris: Masson et Cie.
- Salem, J. & J.R. Arias. 1979. Aspectos médicos da política florestal. *Supl. Acta Amaz.* 9: 185-189.
- Scorza, J.V., M. Valera, C. de Scorza, M. Carnevali, E. Moreno & Lugo-Hernandez. 1979. A new species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 73: 293-298.

- Sergent, E.D. & E.T. Sergent. 1905. Sur un culucide nouveau tier commun à Biskra (*Grabhamia-subtilis*). *Compt. Rend. Soc. Biol.* 57: 673.
- Shaw, J.J. & R. Lainson. 1968. Leishmaniasis in Brazil: II. Observations on enzootic rodent leishmaniasis in the lower amazon region the feeding habits of the vector, *Lutzomyia flaviscutellata* in reference to man, rodents and other animals. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 62: 396-405.
- Short, H.E., R.D. Smith., C.S. Swaminath & K.V. Krishnam. 1931. Transmission of Indian kala-azar by the bite of *Phlebotomus argentipes*. *Indian J. Med. Research.* 18: 1373-1375.
- Theodor, O. 1965. On the classification of American Phlebotominae. *J. Med. Ent.* 2: 171-197.
- Tibayrenc, M.; M.L. Carrion; M.B. Corneau & F.X. Pajot. 1980. Etude allozyme chez *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) vecteur de la leishmaniose en Guyane Francaise. *Cahier O.R.S.T.O.M. Serie Entomologie Medicale et Parasitologie.* 18: 67-70.
- Trebatoski, A.M. & F.J. Haynes. 1969. Comparison of enzymes of twelve species of mosquitoes. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 19: 117-138.
- Wagner, R.P. & R.K. Selander. 1974. Isozymes in insects and their significance. *Annual Review of Entomology* 19: 117-138.
- Wallace, B. 1981. *Basic Population Genetics* Columbia University Press. New York. 688 pp.
- Ward, R.D., R. Lainson & J.J. Shaw. 1973. Further evidence of the role of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector of *Leishmania mexicana amazonensis* in Brasil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 67: 508-609.

- Ward, R.D., R. Lainson & J.J. Shaw. 1977. Experimental transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson & Shaw between hamsters by the bite of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira). *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 71: 265-266.
- Ward, R.D., N. Pasteur & J. Rioux. 1981a. Electrophoretic studies on genetic polymorphism and differentiation of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from France and Tunisia. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 75: 235-245.
- Ward, R.D., S. Bettini, M. Maroli, J.W. Mc.Garry & A. Draper. 1981b. Phosphoglucosomutase polymorphism in *Phlebotomus perfiliewi perfiliewi* Parrot (Diptera: Psychodidae) from Central and North Italy. *Ann. trop. Med. Parasitol.* 75: 653-661.
- Wirth, D.F. & D. MacMahon-Pratt. 1982. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6999-7003.
- Young, D.G. 1979. *A review of the blood sucking Psychodid flies of Colombia* (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Technical Bulletin 806. Agricultural Experiment Station. Institute of Food and Agricultural Science. University of Florida, Gainesville, Florida, USA. 226 pp.
- Young, D.G. & J.R. Arias. 1982. A new phlebotomine sandfly in the *Lutzomyia flaviscutellata* complex (Diptera: Psychodidae) from northern Brazil. *J. Med. Entomol.* 19: 134-138.
- Zeledón, R. 1985. Leishmaniasis in North America, Central America and the Caribbean Island. In: *Leishmaniasis*. Chang/Bray, Eds. Elsevier Science Publishers B.V. 325 pp.

